Revue suisse Zool.	Tome 90	Fasc. 4	p. 857-862	Genève, décembre 1983

Détermination spécifique d'individus vivants des deux espèces jumelles *Sorex araneus* et *S. coronatus*, par deux techniques biochimiques (Insectivora, Soricidae) [1]

par

J. HAUSSER * et N. ZUBER *

Avec 1 figure

ABSTRACT

Specific determination of living individuals of the two sibling species Sorex araneus **and** S. coronatus **(Insectivora, Soricidae) by two biochemical techniques.** — As the morphological determination of living individuals of the two sibling species *S. araneus* and *S. coronatus* is not possible, we have tested two biochemical methods to determine these shrews in ecological studies. After producing specific antibodies by rabbits, we performed an immunological test on 25 individuals. With this first method, a correct determination was achieved in 76% of the cases only. The second method proved very successful: a polyacrylamide gel electrophoresis showed a systematic difference for the albumin (73 individuals analyzed). According to our experience, the necessary blood sampling (10-20 μl) seems harmless for the shrews.

INTRODUCTION

L'existence en Suisse de deux espèces jumelles de musaraignes du genre *Sorex* a été décelée il y a une vingtaine d'années grâce à l'analyse chromosomique (Meylan, 1964). *Sorex coronatus* Millet, 1828, est caractérisé par un nombre autosomique et un nombre fondamental autosomique constants (2Na = 20, NFa = 40) alors que

---

[1] Travail soutenu par le subside n° 3.263.82 du Fonds national suisse de la recherche scientifique.

Poster présenté à l'Assemblée annuelle de la SSZ à Berne, 11-12 mars 1983.

* Institut de Zoologie et d'Ecologie animale, Université de Lausanne, Bâtiment de Biologie, 1015 Lausanne - Dorigny.

S. araneus L., 1758, est soumis à un polymorphisme robertsonien important (2Na = 18-30, NFa = 36). Ces deux espèces font partie du groupe *araneus*, défini par la présence chez le mâle d'un complexe chromosomique sexuel XY_1Y_2 (Litt. in HAUSSER *et al.* 1983). L'étude de leurs caractères externes, notamment la longueur de la queue (OTT 1968) ou la coloration du pelage (OLERT 1973), ne permettent pas une distinction sans équivoque de ces deux espèces. Elles peuvent en revanche être séparées de façon satisfaisante sur la base de mesures ostéométriques (HAUSSER & JAMMOT 1974; LOCH 1977). Récemment, des études de génétique biochimique ont révélé une différence diagnostique de mobilité électrophorétique de l'isocitrate deshydrogénase à migration cathodique (IdH-2) chez ces deux espèces (CATZEFLIS *et al.* 1982).

L'application de ces diverses méthodes de détermination a permis de préciser la distribution géographique de ces deux formes. En Suisse, elles sont en général parapatriques, la ségrégation se faisant surtout selon l'altitude (HAUSSER 1978). Quelques zones de contact ont été répertoriées (MEYLAN 1964; OTT 1968; HAUSSER 1978). Dès lors, il paraissait intéressant d'étudier, dans ces zones de sympatrie, les relations écologiques de ces deux espèces en général mutuellement exclusives.

Toutefois, l'absence de critère fiable permettant la détermination d'individus vivants a empêché jusqu'ici une étude suivie sur la terrain. Il fallait donc mettre au point une méthode de détermination sûre et relativement simple, ce que nous avons tenté au moyen de deux techniques biochimiques: un test d'hémagglutination et une séparation électrophorétique des protéines plasmatiques sur gel de polyacrylamide. Ce travail présente les résultats obtenus et leur confrontation avec ceux des techniques disponibles nécessitant le sacrifice des animaux.

MATÉRIEL ET MÉTHODE

Les 79 musaraignes étudiées au cours de ce travail ont été piégées vivantes au moyen de trappes de type Longworth dans une région du Jura vaudois (CH) où les deux espèces se trouvent en contact (communes de Bassins, St-Cergue, Arzier et Le Vaud). Ramenées à notre Institut, elles ont été conservées en captivité durant quelques jours à quelques mois, selon les besoins expérimentaux.

La détermination spécifique des individus est basée sur une ou plusieurs des méthodes existantes, à savoir: l'analyse chromosomique (MEYLAN & HAUSSER 1973), la morphométrie mandibulaire (HAUSSER & JAMMOT 1974) ou la biochimie (CATZEFLIS *et al.* 1982).

Afin d'obtenir des anticorps spécifiques, des lapins ont été immunisés avec des globules rouges (GR) d'une des espèces de *Sorex*. Après anesthésie des musaraignes, leur sang est prélevé en présence d'héparine (environ 0,3 ml par individu) et lavé 4 à 5 fois dans 0,8 ml de PBS (NaCl 0,145 M; Na_2HPO_4 5mM; pH: 7,4). Les GR ainsi obtenus sont dilués à $1\text{-}2.10^7$ cellules/ml et conservés à $-30°$ C. Toutes les deux semaines, 0,5 ml de cette suspension sont injectés aux lapins. Cette dose est divisée en une dizaine de piqûres sous-cutanées réparties sur un flanc. Lors des 4 premières séries, 0,5 ml d'adjuvant de Freund complet y sont ajoutés. La première prise de sang est effectuée à la veine externe de l'oreille, 7 jours après la cinquième injection. Les prélèvements subséquents se font 7 à 10 jours après une resensibilisation. Après coagulation de 2 heures à température ambiante, le sérum est séparé du caillot et décomplémenté à 56° C pendant une heure. La purification est obtenue par fixation des anticorps non spécifiques à la surface de GR de l'autre espèce au cours d'une absorption de 2 heures à 20° C, puis d'une heure à 4° C (5.10^8 GR permettent d'absorber 100 μl de sérum non dilué). Une

centrifugation de 10 min à 2500 tpm permet l'élimination du précipité, le surnageant constituant le sérum purifié. 4 lapins ont été immunisés avec des GR de *S. coronatus* et 2 avec ceux de *S. araneus*.

Pour les tests immunologiques, une micro-goutte de sang (2 μl) est prélevée, en présence d'héparine, à la base de la queue de la musaraigne puis mélangée, sur lame, à 30 μl de sérum et laissée au repos pendant 3 à 15 min. Cette technique de prélèvement sur des animaux vivants permet de récolter 20 μl de sang sans qu'aucun effet néfaste n'ait été constaté. De tels échantillons sont conservés à −30° C et utilisés par la suite pour l'électrophorèse.

La séparation électrophorétique sur gel de polyacrylamide (PAA) est effectuée avec un appareillage Havanna de Desega, qui permet la réalisation simultanée de 4 gels verticaux de 11 cm × 11 cm × 1,5 mm, contenant chacun 12 échantillons. Les solutions de PAA, de tampon et la préparation des échantillons sont modifiées de LAEMMLI (1970) pour la séparation de protéines non dénaturées (pas de détergent, ni d'immersion dans l'eau bouillante). Un courant de 10 mA est appliqué pendant la migration, à 5° C, dans le gel de concentration (3%) puis de 20 mA dans celui de résolution (6%) jusqu'à ce que le front atteigne la base du support (environ 4h30). Une coloration au bleu de Coomassie R250 (5‰) révèle les protéines plasmatiques totales. Pour obtenir une bonne concentration de l'albumine, nous avons utilisé des échantillons de 8-10 μl de sang dilué 1:40 ou de plasma 1:20, additionnés de 10% de glucose.

RÉSULTATS

Les résultats des déterminations des 79 individus utilisés lors de cette étude sont présentés au Tableau 1. L'établissement de la formule chromosomique a permis la distinction de 21 *S. coronatus* et 25 *S. araneus*. La majorité de ceux-ci possèdent un 2Na de 20, mais un faible polymorphisme existe néanmoins, 5 individus comptant 21 autosomes. L'électrophorèse sur gel d'amidon, suivie d'une révélation enzymatique d'IdH-2, a été appliquée indifféremment à des broyats de cœur, de foie ou de muscle. Des 66 individus testés selon cette méthode, 26 présentent une migration lente (−80) typique de *S. coronatus* et 39 l'électromorphe rapide (−100) de *S. araneus*. Le dernier animal se distingue par la présence de 3 bandes, dont une intermédiaire, schéma caractéristique des hétérozygotes pour un enzyme fonctionnel à l'état de dimère, tel IdH-2 (CARLIER & PANTALONI 1973). Le caryotype et la morphologie mandibulaire ont permis de l'attribuer à l'espèce *S. araneus*. Les 4 mesures prises sur les mandibules des 79 individus fournissent une détermination correcte pour 76 d'entre eux. Les 3 *S. araneus* mal classés possèdent un coefficient discriminant très proche de zéro.

L'attribution spécifique de chaque individu, ainsi établie, nous a permis d'estimer la validité des 2 nouvelles techniques (Tab. 1). Bien qu'une production d'anticorps anti-*Sorex* ait pu être révélée après 5 semaines d'immunisation, une purification suffisante, susceptible de mettre en évidence une différence spécifique, n'a toutefois pu être obtenue avant 10 semaines de traitement. Les résultats des tests sont interprétés de la façon suivante:

+ + +	excellente coagulation, quasi immédiate
+ +	bonne coagulation
+	coagulation faible, visible à l'œil nu
+ −	coagulation faible, visible uniquement à la loupe
−	aucune coagulation

	C	M	I	H	A
C	46 / 100%				
M	46 / 93%	79 / 96%			
I	39 / 97%	66 / 94%	66 / 98%		
H	11 / 73%	25 / 72%	21 / 86%	25 / 76%	
A	45 / 100%	73 / 96%	63 / 98%	20 / 80%	73 / 100%

TAB. 1.

Nombre d'individus analysés et pourcentage d'attributions correctes pour chaque méthode et comparaison de méthodes. (C = caryologie, M = morphométrie mandibulaire, I = électrophorèse d'IdH-2, H = test d'hémagglutination, A = électrophorèse d'albumine).

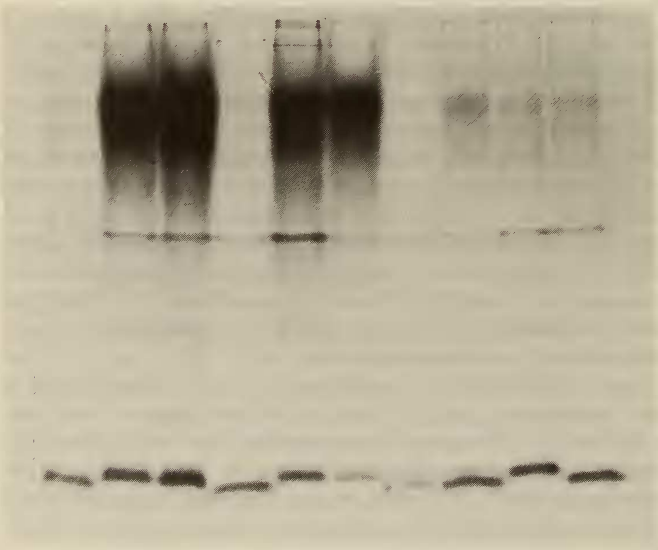

FIG. 1.

Electrophorèse sur gel de polyacrylamide montrant une différence spécifique du schéma de migration de l'albumine.
(C = *Sorex coronatus*, A = *S. araneus*).

Seuls les 3 premiers sont dits positifs. La plupart des tests n'ont été effectués qu'avec le sérum anti-*S. coronatus*, l'immunisation réciproque ayant débuté plus tard. Notre analyse, portant sur 25 individus, a mis en évidence une réaction positive de 6 *S. araneus*, lesquels sont donc mal attribués, la réponse au test étant spécifiquement conforme dans les autres cas.

L'électrophorèse sur gel de PAA a révélé une distinction constante au niveau de l'albumine, protéine migrant dans la partie la plus distale du gel (Fig. 1). La distance de cette bande à l'origine est plus faible pour *S. coronatus* que pour *S. araneus*, la différence dans les conditions expérimentales utilisées étant d'environ 2 mm. Les 73 individus analysés ainsi présentent la bande propre à leur espèce.

DISCUSSION

Des 3 méthodes déjà existantes, la plus ancienne, la caryologie, est également la plus fiable. Bien que cette étude ait essentiellement porté sur la zone de contact entre les deux espèces, aucun hybride n'a été trouvé dans l'échantillon analysé. Les résultats fournis par IdH-2 sont également très sûrs, malgré la détection d'un individu hétérozygote pour ce locus. En ostéométrie, une détermination correcte de 96,2% des animaux étudiés est hautement compatible avec la valeur théorique de 95,3% (HAUSSER & JAMMOT 1974). Le matériel analysé pour cette étude nous permet donc de confirmer la validité des critères de détermination existants à un niveau très local.

La détermination par l'immunologie présente un avantage évident: une fois le sérum mis au point, les tests peuvent être effectués sur le terrain, permettant ainsi une attribution spécifique quasi instantanée. Cette donnée peut être souhaitable dans certains cas. Malheureusement, le pourcentage d'erreurs actuellement observé (24%) est trop élevé pour autoriser son emploi dans la zone de contact. Diverses hypothèses peuvent être émises quant à leur origine. D'une part, l'hémagglutination observée peut correspondre à une non spécificité de l'antigène purifié, qui se trouverait simultanément à la surface des GR de tous les individus de l'espèce d'immunisation et de certains de l'autre espèce. Dans ce cas, la validité de notre technique est remise en question. D'autre part, ces déterminations erronées peuvent provenir d'une purification insuffisante du sérum ne se révélant que chez les individus aux structures antigéniques aspécifiques particulièrement nombreuses, ou encore d'une détérioration de la qualité du sérum suite à des décongélations répétées ou à une conservation inappropriée. Ainsi, le stockage de GR humains dans certains emballages plastiques entraîne des réactions d'incompatibilité antigéniques atypiques (CALLAHAN *et al.* 1982). L'absence de test réciproque nous empêche de choisir parmi ces hypothèses. Il faut cependant signaler que la purification des sérums est peu aisée. La standardisation de cette étape est problématique, vu l'utilisation, lors des essais successifs, de GR d'individus différents, possédant leurs particularités antigéniques propres en plus de celles caractéristiques de l'espèce. Elle s'avère en outre coûteuse en animaux.

La différence de migration de l'albumine est stable dans l'échantillon analysé. Le prélèvement de ce dernier ne semble poser aucun problème vu le faible volume nécessaire et sa bonne tolérance par les musaraignes. De plus, la conservation du sang est peu délicate: dans un tube hermétiquement fermé, il peut être transporté à température ambiante puis conservé soit au frigo quelques jours (+ 4° C) soit congelé (−30° C) pendant plus d'une année. Cette technique se prête donc bien à un travail écologique.

Notre étude ayant porté sur un échantillon géographiquement très localisé, il serait hasardeux de généraliser son emploi à d'autres régions sans y avoir au préalable testé sa validité. Toutefois, des résultats concordants ont été obtenus pour 6 autres localités de Suisse romande, laissant espérer une application plus étendue.

Etant donné les problèmes rencontrés lors de la purification des sérums, le nombre élevé de musaraignes qu'elle nécessite et la moins grande fiabilité de la méthode immunologique, nos préférences vont à une détermination électrophorétique. Son utilisation aisée et la sûreté des résultats compensent largement, à nos yeux, les avantages d'une détermination immédiate.

Résumé

Afin de mettre en évidence un critère fiable permettant la détermination d'individus vivants des 2 espèces jumelles *Sorex araneus* et *S. coronatus*, deux techniques biochimiques sont testées. Un test d'hémagglutination, au moyen d'anticorps spécifiques produits par des lapins, n'a permis une détermination correcte que dans 76% des cas (25 individus); en revanche, une électrophorèse sur gel de polyacrylamide a révélé une différence systématique au niveau de l'albumine pour les 73 animaux analysés. Le prélèvement de sang (10-20 µl) nécessaire à leur réalisation n'a aucun effet néfaste sur les musaraignes.

BIBLIOGRAPHIE

Callahan, J. T., M. F. Collecutt, J. R. Lightbody and B. S. Faragher. 1982. Alteration of human red blood cells stored in plastic packs. A case report with *in vivo* and *in vitro* studies. *Transfusion* 22: 154-157.

Carlier, M.-F. and D. Pantaloni. 1973. NADP-linked isocitrate dehydrogenase from beef liver. Purification, quaternary structure and catalytic activity. *Eur. J. Biochem.* 37: 341-354.

Catzeflis, F., J.-D. Graf, J. Hausser et P. Vogel. 1982. Comparaison biochimique des musaraignes du genre *Sorex* en Europe occidentale (Soricidae, Mammalia). *Z. zool. Syst. Evolut.-forsch.* 20: 223-233.

Hausser, J. 1978. Répartition en Suisse et en France de *Sorex araneus* L., 1758 et de *Sorex coronatus* Millet, 1828 (Mammalia, Insectivora). *Mammalia* 42: 329-341.

Hausser, J., F. Catzeflis, A. Meylan and P. Vogel. 1983. Speciation in the *Sorex araneus* complex (Mammalia, Insectivora). *Acta zool. fenn.* 170: proc. III ITC vol. II, sous presse.

Hausser, J. et D. Jammot. 1974. Etude biométrique des mâchoires chez les *Sorex* du groupe *araneus* en Europe continentale (Mammalia, Insectivora). *Mammalia* 38: 324-343.

Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.

Loch, R. 1977. A biometrical study of karyotypes A and B of *Sorex araneus* L., 1758, in the Netherlands (Mammalia, Insectivora). *Lutra* 19: 21-36.

Meylan, A. 1964. Le polymorphisme chromosomique de *Sorex araneus* L. (Mamm.-Insectivora). *Revue suisse Zool.* 71: 903-983.

Meylan, A. et J. Hausser. 1973. Les chromosomes des *Sorex* du groupe *araneus-arcticus* (Mammalia, Insectivora). *Z.* Säugetierkde 38: 143-158.

Olert, J. 1973. Cytologisch-morphologische Untersuchungen an der Waldspitzmaus (*Sorex araneus* L., 1758) und der Schabrackenspitzmaus (*Sorex gemellus* Ott, 1968) (Mammalia, Insectivora). *Veröff. Univ. Innsbruck* 76.

Ott, J. 1968. Nachweis natürlicher reproduktiver Isolation zwischen *Sorex gemellus* sp. n. und *Sorex araneus* L., 1758, in der Schweiz. *Revue suisse Zool.* 75: 53-75.